

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Gabriela Bouça Marques da Costa

**Produção e Caracterização de Xilanases obtidas por
Fermentação em Estado Sólido**

Rio de Janeiro

2017

Gabriela Bouça Marques da Costa

**Produção e Caracterização de Xilanases obtidas
por Fermentação em Estado Sólido**

Projeto Final de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Orientadora: Denise Maria Guimarães Freire (IQ-UFRJ)

Co-orientador: Mateus Gomes de Godoy (IMPG-UFRJ).

Rio de Janeiro

2017

RESUMO

Costa, Gabriela Bouça Marques. **Produção e Caracterização de Xilanases obtidas por Fermentação em Estado Sólido**. Rio de Janeiro, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O setor Agroindustrial Brasileiro gera uma quantidade considerável de resíduos, como por exemplo o farelo de cacau. Assim, o uso destes em novos processos se torna essencial, visto que a sociedade atual necessita investir no reaproveitamento de resíduos e na minimização do desperdício. Deste modo, a fermentação em estado sólido (FES) surge como uma boa ferramenta para reutilização de resíduos agrícolas, e além disso, como forma de produzir produtos de alto valor agregado, como as xilanases. As xilanases são uma classe de enzimas que catalisam a degradação das ligações β -1,4 da xilana (componente do material hemicelulósico) e que vem sendo utilizadas em diversas aplicações industriais como por exemplo: fabricação de pães, biscoitos e bebidas; geração de biocombustíveis como o etanol; indústria farmacêutica; e na fabricação de papel e celulose. O fungo *Aspergillus awamori* (IOC 3914) foi capaz de crescer e produzir xilanases em meio de cultivo contendo farelo de cacau suplementado com 2% de ureia. A atividade obtida foi de 57,6 U/g atingida no tempo de cultivo de 72h. As condições reacionais, temperatura e pH, foram avaliadas pela técnica do planejamento experimental e a atividade enzimática máxima obtida (aproximadamente 70 U/g) ocorreu numa faixa de temperatura entre 40-50°C e com pH variando entre 6,0 e 4,0. Além disso, a xilanase produzida apresentou uma boa estabilidade térmica na faixa de temperatura de 30-40°C e pH entre 4,0 a 7,0. As características bioquímicas deste preparado bruto rico em xilanases são compatíveis com seu uso na indústria de panificação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, em especial, aos meus pais que sempre colocaram tanto os meus estudos, quanto os do meu irmão em primeiro lugar. Reconheço e agradeço muito todos os sacrifícios feitos para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos e sonhos.

A minha orientadora Denise, pela acolhida, mesmo com o tempo curto para finalizar o trabalho, sempre acreditou que daria certo.

Ao meu co-orientador Mateus pela paciência em responder todos os meus muitos e-mails cheios de dúvidas.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial a Maysa, por ter me ensinado simplesmente tudo que eu precisei, pelos fins de semana que você teve que ir no LaBim por minha causa e pela companhia maravilhosa.

Aos meus amigos queridos que o Instituto de Química me deu de presente, pelas infinitas risadas, e pelos momentos de suporte mútuo. Vocês tornaram essa jornada muito mais fácil, muito obrigada.

Finalmente, pelos meus amigos de vidas que suportaram todas as minhas reclamações sobre o fundão, me fizeram ter forças para prosseguir e por serem o meu refúgio sempre que eu precisei

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 O Cacau e sua Indústria	10
1.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)	12
1.3 Xilanases	14
1.4 Peptidases	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Matéria Prima.....	23
3.2 Microrganismo	23
3.3 Propagação de Inóculo.....	23
3.4 Processo de FES.....	23
3.5 Medida de pH.....	23
3.6 Medida de Umidade	23
3.7 Atividade de água	23
3.8 Extração de Xilanase e Peptidase	24
3.9 Quantificação da atividade de Xilanase	24
3.10 Quantificação da atividade de peptidase	24
3.11 Efeito do pH e da temperatura na atividade da xilanase	25
3.12 Estabilidade térmica e ao pH	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Perfil de produção de xilanase	26
4.2 Influência da temperatura e pH na atividade xilanásica	28
4.3 Estabilidade térmica e ao pH	34
5 CONCLUSÃO	37

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
---	-----------

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma do beneficiamento do chocolate (adaptado de RODRIGUES, <i>et al.</i> 2011).	10
Figura 2: Representação do crescimento de um fungo filamentoso (COUTO e SANROMÁN, 2006)	14
Figura 3: Estrutura da xilana e ação da xilanase. (HELD, 2012)	15
Figura 4: Estrutura da xilana e enzimas do complexo xilanolítico (AMORIM, 2017).16	
Figura 5: Mecanismo de reação das xilanases. (A) a estrutura em hélice da xilana é posicionada no sítio ativo da enzima entre o Glu ¹⁷² e o Glu ⁷⁸ ; (B) A xilobiose é ligada no Glu ⁷⁸ e este intermediário sofre hidrólise; (C) Dissociação da xilobiose do sítio ativo permitindo nova reação enzimática (adaptado de JEFFRIES, 1996).	19
Figura 6: Esquema simplificado da rota de obtenção de etanol e xilitol por microrganismos (POLIZELI, 2005)	20
Figura 7: Perfil de produção de xilanase do fungo <i>A. awamori</i> em farelo de cacau (suplementado com 2% de Ureia) a 30°C e 60% de umidade inicial.	26
Figura 8: Perfil da atividade de xilanase e peptidase ao longo da FES.....	28
Figura 9: Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados da atividade de xilanase (U/g) após 72h.....	30
Figura 10: Valores de atividade de xilanase observados x valores de atividades preditos pelo modelo.	32
Figura 11: Superfície de resposta para atividade de xilanase (U/g) em função da temperatura e pH.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composições químico-bromatológica do farelo de cacau quanto aos valores de matéria seca (MS %), matéria mineral (MM %), proteína bruta (PB %), energia bruta (EB kcal/kg), fibra bruta (FB %), fibra em detergente ácido (FDA %) , fibra em detergente neutro (FCN %) e Extrato Etéreo (EE %) segundo RODRIGUES, <i>et al.</i> , (2010) e CARVALHO, <i>et al.</i> , (2008).....	11
Tabela 2: Valores da atividade de xilanase (A) nas diferentes condições de ensaio do DCCR (níveis codificados e valores reais).....	29
Tabela 3: Coeficientes de regressão para a atividade de xilanase.....	30
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) do DCCR para a atividade de xilanase.....	31
Tabela 5: Estabilidade térmica e ao pH de xilanase obtida por <i>A.awamori</i> através de FES em farelo de cacau.....	35
Tabela 6: Estabilidade Térmica e ao pH da enzima comercial CeluMax C (PROZYN).....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Aw: Atividade de água

CEPLAC: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

EB: Energia Bruta

FB: Fibra Bruta

FC: Farelo de Cacau

FCN: Fibra em Detergente Neutro

FDA: Fibra em Detergente Ácido

FES: Fermentação em Estado Sólido

MM: Matéria Mineral

MS: Matéria Seca

PB: Proteína Bruta

PDA: Potato Dextrose Agar

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Cacau e sua Indústria

O cacau (*Theobroma cacao*) é um produto nobre, tradicional da cultura brasileira, sendo cultivado nas regiões norte e nordeste (CARDOSO *et al.*, 2002). Durante seu processamento, as sementes são torradas, trituradas e/ou prensadas. As amêndoas prensadas são destinadas a indústria do chocolate, enquanto a manteiga de cacau (extraída da semente de cacau) é destinada às indústrias farmacêuticas e cosméticas (SALTINI, AKKERMAN e FROSH, 2013).

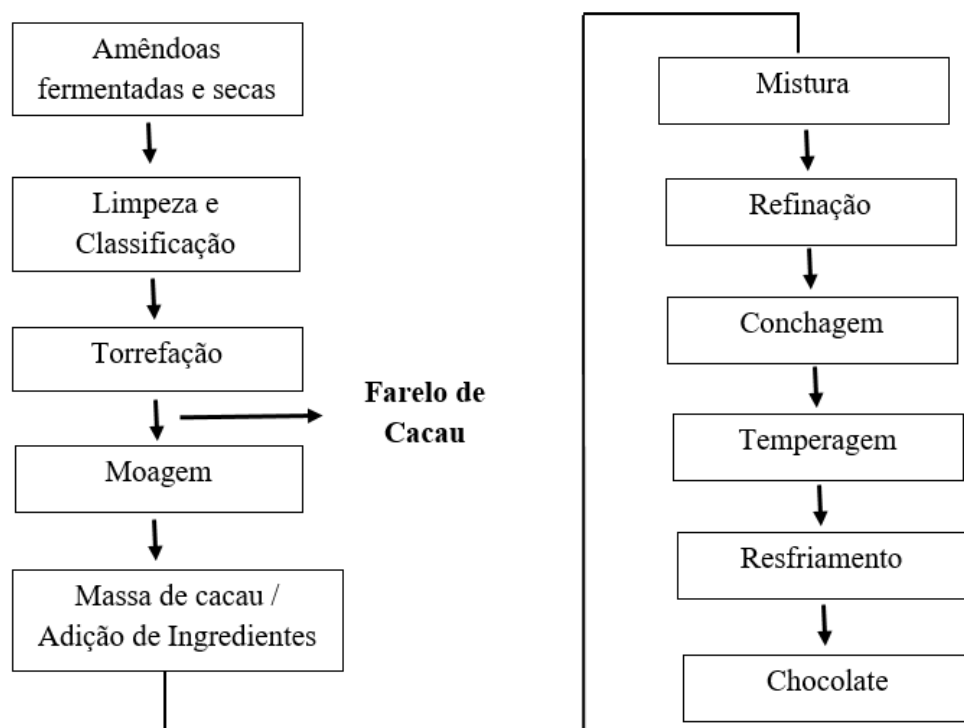


Figura 1: Fluxograma do beneficiamento do chocolate (adaptado de RODRIGUES, *et al.* 2011).

A partir do beneficiamento do cacau, o farelo de cacau é gerado como resíduo na etapa de torrefação (Figura 1) (NETO, *et al.*, 2008). Nesta etapa, os grãos são torrados a 150°C e após o tratamento térmico, os grãos se tornam mais quebradiços e a casca se desprende da semente, constituindo o farelo de cacau. Neste processo, pedaços do grão podem ficar aderidos à casca, o que dá ao farelo de cacau uma composição heterogênea (PIRES, VIEIRA, *et al.*, 2005).

O estado da Bahia é responsável por toda produção de cacau do Nordeste e por 68,9% da produção total brasileira no ano de 2016, segundo a Comissão Executiva

do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). No Parque Industrial de Ilhéus, na Bahia, processam-se 450 toneladas de amêndoa seca de cacau, o que gera 45 toneladas diárias de farelo (dados estimados nas quatro unidades processadoras no ano de 2003). No ano de 2016 foram produzidas, no Brasil 214.741 toneladas de cacau, enquanto que no ano de 2017, estima-se uma produção de 275.794, gerando um aumento de 28,4% na produção de cacau (IBGE, 2017).

A composição químico-bromatológica do farelo de cacau está apresentada na tabela 1. Por causa da heterogeneidade do resíduo, o teor de proteína no farelo de cacau varia de 12 a 20% (PIRES, *et al.*, 2005). Devido ao alto valor proteico do farelo do cacau, este resíduo pode ser utilizado na alimentação animal, porém, o farelo de cacau apresenta alguns compostos antinutricionais em sua composição, como as metilxantinas, conferindo uma limitação no uso do resíduo para este fim. A teobromina é a metilxantana que está presente em maior quantidade, seu teor varia de 1 a 2% no grão sem beneficiamento, seguida pela cafeína, que está presente numa concentração de 0,1% no grão (AMORIM, 2016).

Tabela 1: Composições químico-bromatológica do farelo de cacau quanto aos valores de matéria seca (MS %), matéria mineral (MM %), proteína bruta (PB %), energia bruta (EB kcal/kg), fibra bruta (FB %), fibra em detergente ácido (FDA %) , fibra em detergente neutro (FCN %) e Extrato Etéreo (EE %) segundo RODRIGUES, *et al.*, (2010) e CARVALHO, *et al.* , (2008).

Composição	Rodrigues, et al 2010	Carvalho, et al 2008
MS	91,8	89,8
MM	6,1	-
PB	13,0	13,5
EB	3813	-
FB	26,0	-
FDA	34,0	40,0
FDN	41,0	48,5
EE	-	9,9

Os resíduos obtidos por meio do processamento do cacau já vêm sendo utilizados na produção de biogás, no processo de compostagem, na obtenção de proteína microbiana e na alimentação animal (NETO, VELOSO, *et al.*, 2008).

1.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A bioconversão dos resíduos agrícolas está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Neste contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano pode ocorrer a síntese de diversos compostos de elevado valor agregado, com concomitante destoxificação do resíduo (GODOY, 2013).

A FES é um processo onde microrganismos crescem utilizando um substrato sólido na ausência, ou quase, de água livre visível (HANSEN, *et al.*, 2015). A umidade do substrato deve ser mantida de modo que seja garantido o metabolismo e crescimento celular, sem exceder sua capacidade máxima de retenção de água (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002) (PANDEY, 2003). A água presente nesses sistemas se encontra ligada ao sólido, formando uma fina camada na superfície das partículas (CASTRO, *et al.*, 2010).

Neste processo, os fungos filamentosos podem crescer de maneira muito semelhante ao crescimento em habitat natural, ou seja, crescem no interior da matriz ou na superfície. A matéria prima utilizada na FES pode ser apenas um suporte, sendo necessário o acréscimo de nutrientes, como também pode ser, ao mesmo tempo, suporte e substrato. (RAHARDJO, TRAMPER e RINZEMA, 2006). Além disso, o meio sólido apresenta alta heterogeneidade, por isso o substrato pode não estar completamente disponível para o microrganismo.

O cultivo em meio sólido sofre influências de parâmetros como: umidade, atividade de água (a_w), pH, temperatura e transferência de calor, concentração de nutrientes, tamanho da partícula e concentração de inóculo (PINTO, *et al.*, 2005).

A temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, o crescimento celular e a formação de produtos. A atividade metabólica do microrganismo gera liberação de calor, o que pode levar a formação de gradientes de temperatura dentro

do reator, afetando negativamente a produtividade de metabólitos de interesse (PANDEY, 2003).

A determinação do pH em substratos sólidos não é representativa. Apenas o pH global é medido, porém este não representa o pH de microambientes do filme aquoso onde as reações bioquímicas acontecem (PALMA, 2003). Grande parte dos fungos filamentosos cresce e secreta enzimas mais estáveis sob grandes variações de pH, sendo a faixa mais favorável entre pH 5 e 7. (PANDEY, 2003; PERAZZO NETO, 1999).

Já o tamanho da partícula utilizada no processo fermentativo pode influenciar o crescimento do microrganismo ao permitir ou não o acesso aos nutrientes. Além disso, ao se utilizar partículas muito finas pode ocorrer a compactação do meio, tornando as transferências de calor e massa difíceis de serem realizadas, enquanto a utilização de partículas maiores diminuem a superfície de contato do microrganismo com o substrato (PANDEY, *et al.*, 1999).

A concentração de inóculo utilizada no processo de FES pode influenciar a quantidade de metabólitos obtidos, uma vez que utilizar uma baixa concentração de inóculo pode favorecer a contaminação do cultivo e levar a baixa concentração celular. Por outro lado, uma alta concentração de inóculo pode exaurir os nutrientes facilmente acimiláveis do meio, reduzindo a quantidade de produto formado (ARAÚJO, 2004).

A umidade e a atividade de água têm influência significativa na FES devido a elevada interação entre a água e as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS e MOLIN, 2003). A umidade está relacionada com a porcentagem de água na massa total do meio, já a atividade de água é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, está relacionado à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato, afetando diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO, 2005). Um elevado nível de umidade pode diminuir as trocas gasosas e aumentar o risco de contaminação do cultivo, enquanto que uma umidade mais baixa pode levar a um menor crescimento (AMORIM, 2016).

Alguns tipos de microrganismos, como as leveduras e bactérias, são capazes de crescer em meio sólido, porém fungos filamentosos se destacam pela maior adaptação a FES. Estes podem crescer em ambientes com pouca água e muitos

sólidos presentes, produzindo uma variedade de metabolitos de interesse biotecnológico. Sua forma de crescimento (Figura 2), por meio de hifas, facilita a colonização do meio sólido, conferindo uma vantagem ao uso deste microrganismo em comparação ao uso de microrganismos unicelulares.

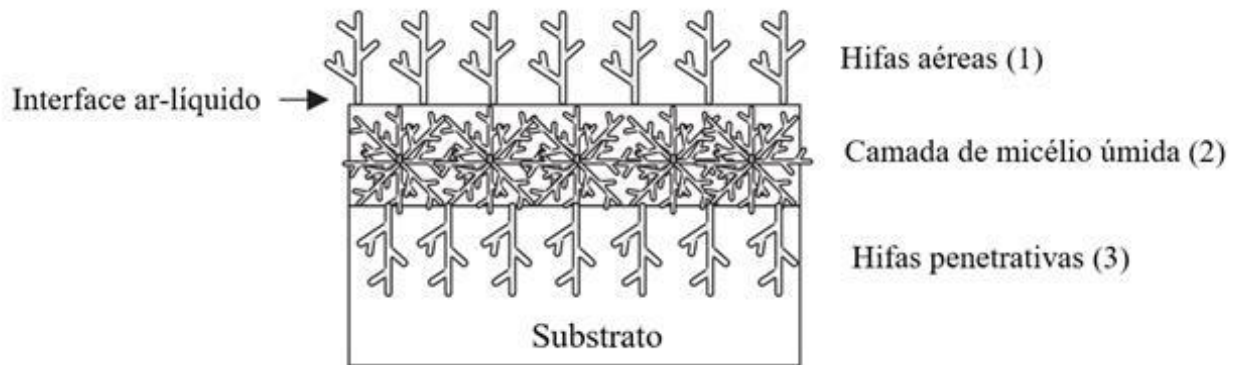


Figura 2: Representação do crescimento de um fungo filamentoso (COUTO e SANROMÁN, 2006)

Os micélios, constituídos por uma rede tridimensional de hifas, crescem inicialmente no interior da matriz do substrato (hifas penetrativas) e aparecem sobre a interface ar-líquido (hifas aéreas). Conforme o micélio cresce, a densidade das hifas aéreas aumenta de tal forma que seus poros ficam cheios de água, fazendo com que estas se tornem a camada de micélio úmida (camada 2). A espessura da camada 2 aumenta de maneira que sua parte inferior se torna anaeróbica. Por fim, a concentração de oxigênio se esgota na matriz sólida, fazendo com que a camada de micélio úmida e o micélio das hifas penetrativas parem de crescer (COUTO e SANROMÁN, 2006; RAGHAVARAO et al., 2003; EDELSTEIN e SEGEL, 1983).

Os fungos filamentosos, como o *Aspergillus awamori*, ao crescer no meio sólido, degradam os polímeros estruturais do substrato, como celulose e hemicelulose (CARVALHO, 2008), por meio da atuação de enzimas extracelulares como celulasas (CASTRO, CASTILHO e FREIRE, 2015) e xilanases. (BOTELLA, et al., 2007).

1.3 Xilanases

As xilanases são enzimas extracelulares responsáveis pela degradação da xilana, catalisando a hidrólise das ligações β -1,4 presentes neste polímero vegetal, que é componente da hemicelulose. A xilana (Figura 3) está presente na parede celular primária e secundária juntamente com a celulose e a lignina. Dentro da

estrutura da parede celular, estes três constituintes interagem por meio de ligações covalentes e interações não-covalentes, onde a xilana é encontrada na interface entre a lignina e a celulose. Deste modo, acredita-se que a xilana é importante para a coesão das fibras e para a integridade da parede celular da planta (PINTO, 2005).

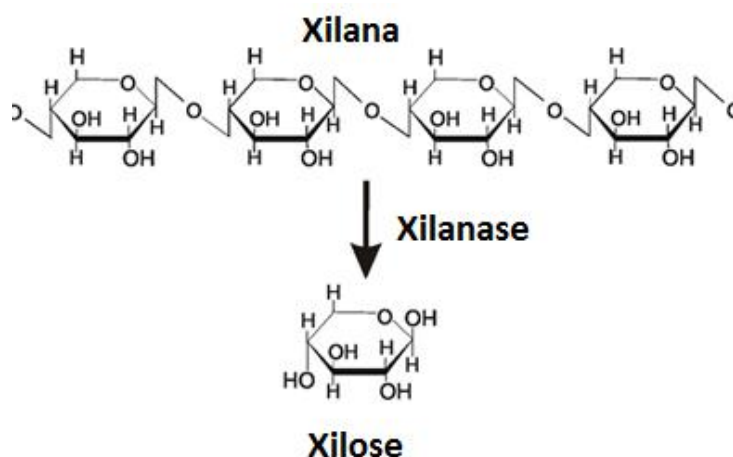


Figura 3: Estrutura da xilana e ação da xilanase. (HELD, 2012)

De maneira similar a outros polissacarídeos de origem vegetal, a xilana possui ampla variedade na sua composição (SUNNA A, 1997). O grau de polimerização também é variável, formando xilanas de madeira dura ou de madeira macia, sendo constituídos por 150-200 e 70-130 resíduos de β -xilopirranose, respectivamente (KULKARNI, SHENDYE e RAO, 1999).

Devido a esta heterogeneidade, a hidrólise da xilana requer a ação de um conjunto de enzimas específicas, chamado complexo xilanolítico. As enzimas que compõem este complexo podem ser divididas em enzimas que são responsáveis por catalisar a hidrólise da cadeia principal, as endo- β -1,4-xilanase e β -xilosidase, e enzimas que catalisam a degradação das cadeias laterais, as α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e a acetilesterase (Figura 4). Para que a degradação seja eficiente, deve haver uma interação mútua entre as enzimas deste complexo. Os fungos filamentosos têm capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, desta forma ocorre, além da hidrólise da cadeia principal da xilana, a hidrólise das suas ramificações (KULKARNI, SHENDYE e RAO, 1999).

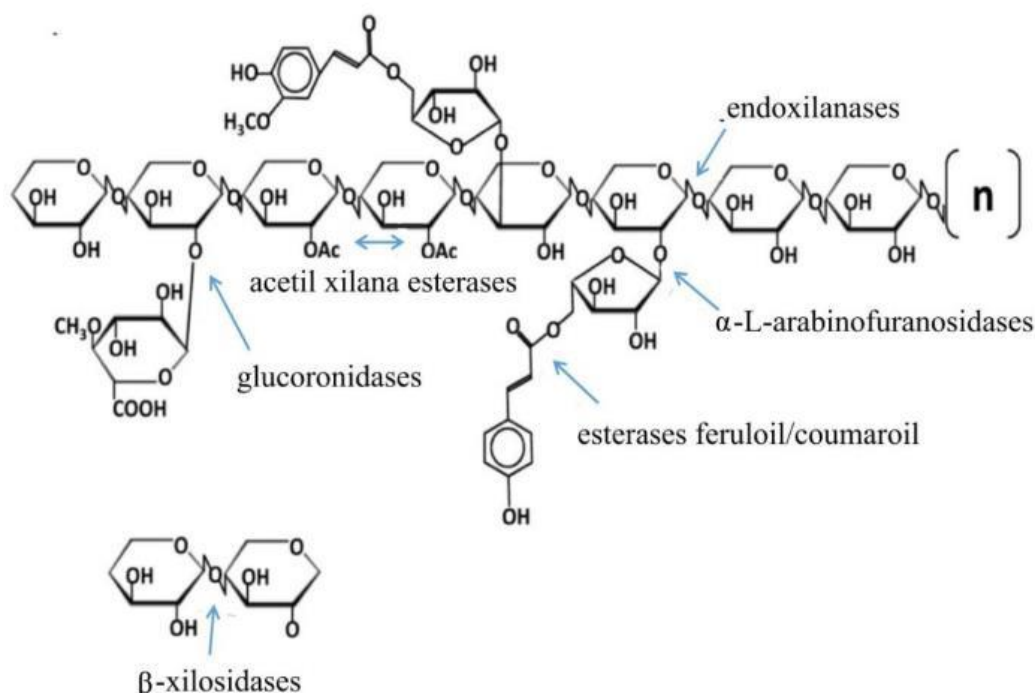


Figura 4: Estrutura da xilana e enzimas do complexo xilanolítico (AMORIM, 2017).

As endo- β -1,4-xilanases formam o maior grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Apesar da predominância de xilana no material hemicelulósico, apenas uma pequena parte deste pode ser degradado pela ação enzimática. Uma das razões para tal é a distribuição heterogênea da hemicelulose, que acaba por limitar o acesso da enzima à xilana, assim como a instabilidade térmica da enzima e a inibição pelo produto final (ONYSKO, 1992).

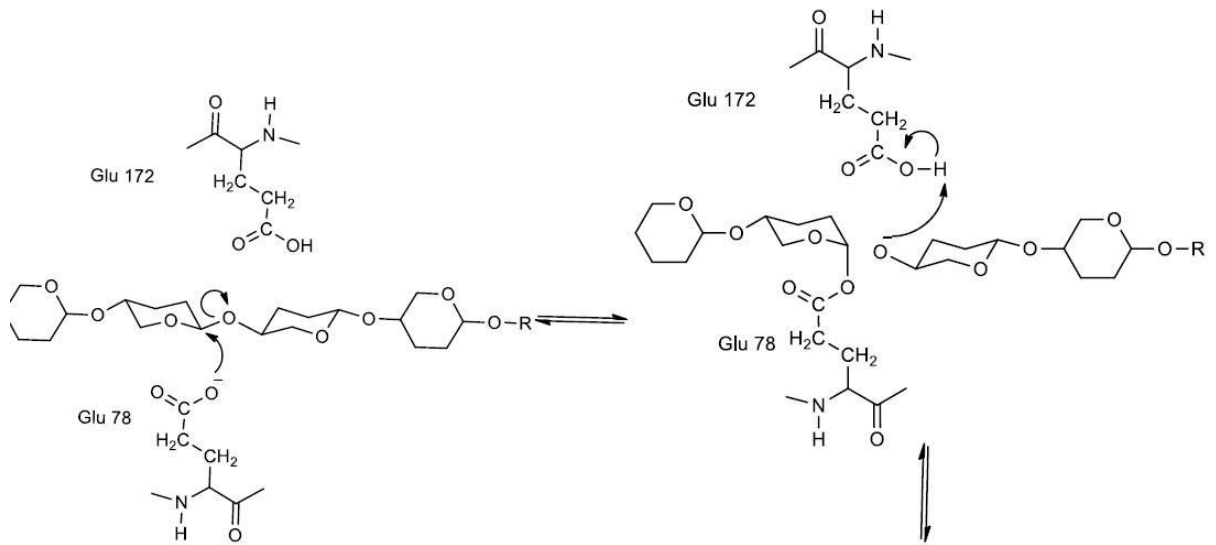
As endo-xilanases podem ser classificadas quanto aos produtos formados, se dividindo naquelas que promovem ou não a liberação de arabinose (DEKKER, 1976) e quanto à natureza do substrato, baseando-se na capacidade de degradação de xilana solúvel ou insolúvel e quanto ao ponto isoelétrico e massa molar (WONG, TAN e SADDLER, 1988). As endo-xilanases fúngicas possuem massas molares entre 7 e 60 kDa e são geralmente mais ativas na faixa de pH entre 3,5 e 6,0 e temperaturas de 40-60°C (TAN, L.U.L., MAYERS, P., SADDLER, J.N., 1987).

HENRISSAT et al., (1993) propuseram uma classificação em relação à estrutura primária dos domínios catalíticos, resultando na classificação de enzimas do complexo xilanolítico em famílias. Foram descritas 106 famílias, onde as endo-xilanases se encontram nas famílias 10 (F) e 11(G). As xilanases da família 11 são

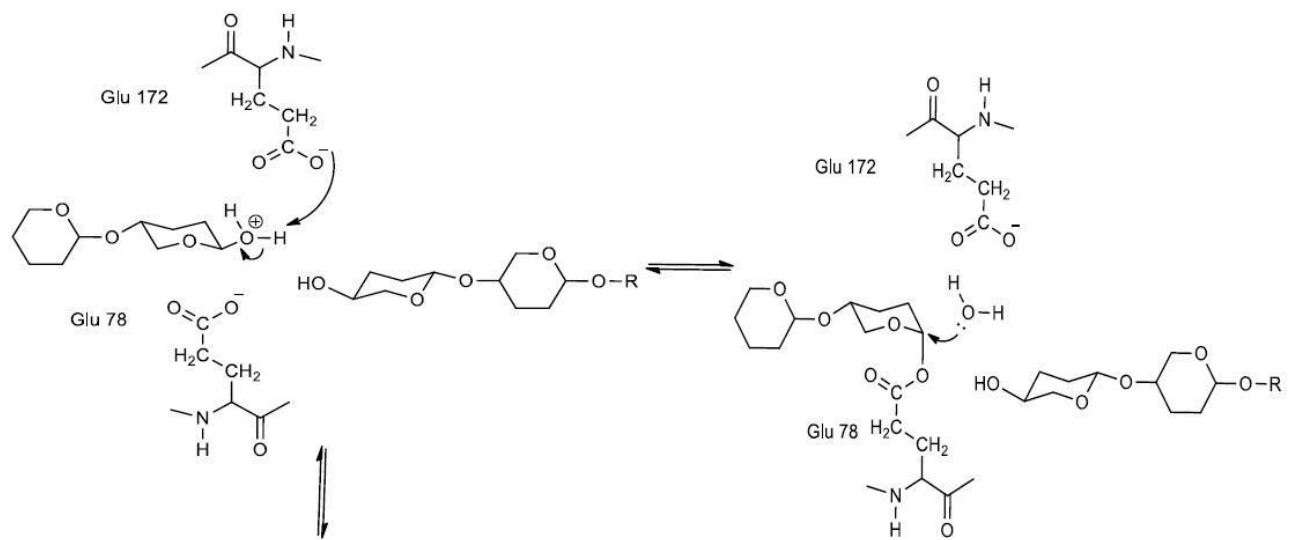
menores e mais específicas para xilana, atuando em substratos que contém resíduos de D-xilose. Por este motivo, são consideradas xilanases verdadeiras (KULKARNI, SHENDYE e RAO, 1999). Os produtos de hidrólise liberados por esta classe de enzimas são degradados pelas enzimas da família 10 (JEFFRIES, 1996; BIELY, 1993).

O mecanismo enzimático proposto para a hidrólise das arabioxilanas pelas xilanases ocorre pelo processo catalítico ácido-base (figura 5). O resíduo Glu¹⁷² é o catalisador ácido-base e o resíduo Glu⁷⁸ é o nucleófilo. A ligação glicosídica é quebrada pelo ataque nucleofílico do Glu⁷⁸ do sítio ativo da enzima. O C-4 permanece com o oxigênio que estava envolvido na ligação glicosídica e é estabilizado pela transferência de um próton do Glu¹⁷², enquanto o C-1 forma um intermediário com o Glu⁷⁸. Em seguida, o nucleófilo Glu⁷⁸ é hidrolisado, com concomitante hidroxilação do C-1 (carbono glicosil) e transferência do hidrogênio da água para o Glu¹⁷² (OLIVEIRA, 2010)

A



B



C

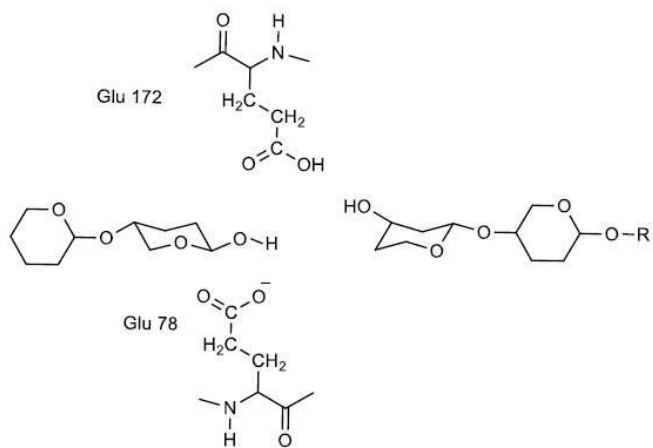


Figura 5: Mecanismo de reação das xilanases. (A) a estrutura em hélice da xilana é posicionada no sítio ativo da enzima entre o Glu¹⁷² e o Glu⁷⁸; (B) A xilobiose é ligada no Glu⁷⁸ e este intermediário sofre hidrólise; (C) Dissociação da xilobiose do sítio ativo permitindo nova reação enzimática (adaptado de JEFFRIES, 1996).

As xilanases têm diversas aplicações industriais, podendo ser utilizada na fabricação de pães, biscoitos e bebidas, geração de biocombustíveis como o etanol, indústria farmacêutica e indústria de papel e celulose.

A utilização de xilanase no processo de panificação auxilia principalmente na degradação da arabioxilana, agindo de forma a solubiliza-la, levando a perda da capacidade de retenção de água e ao aumento da viscosidade. Essa ação, além de remover a arabioxilana insolúvel, que interfere na formação da rede do glúten da massa, aumenta a estabilidade da massa devido ao aumento da viscosidade. Desta forma, melhoram-se as propriedades reológicas da massa, facilitando seu processamento e diminuindo a retrogradação do amido (BECKER, NATALIA BRANCO; BARATTO, CÉSAR MILTON, GELINSKI, JANE MARY LAFAYETTE NEVES, 2009). Como resultado, a massa fica mais estável, flexível, de maior manuseio e o pão obtém melhor desenvolvimento do volume e melhor estrutura de miolo (mais fino e mais macio).

Na indústria de bebidas, as xilanases podem ser utilizadas para reduzir a viscosidade e opacidade, já que reduzem a concentração de β -glicanas. Além disso, estas enzimas aumentam a capacidade de ligação dos fragmentos de arabioxilanas à água, melhorando a filtração (SORENSEN, 2002).

Na indústria de papel e celulose, as xilanases livres de celulase podem ser utilizadas para diminuir a formação de compostos poluidores. No processo de branqueamento de polpa Kraft são utilizados grandes quantidades de produtos organoclorados. Estes atuam degradando a lignina, tornando o papel mais branco, porém há formação de resíduos tóxicos e na necessidade do tratamento dos efluentes. O uso de xilanase pode levar a redução de 5-7 kg de organoclorados por tonelada de efluente Kraft (POLIZELI, 2005), uma vez que a ação desta enzima permite que a lignina seja degradada mais facilmente. Desta forma, necessita-se de uma menor quantidade de organoclorados para realizar o processo, sem comprometer a alvura do papel obtida como resultado final.

Em conjunto com enzimas como celulases, as xilanases podem ser empregadas na geração de biocombustíveis e substâncias de interesse comercial como o xilitol. A bioprodução do etanol necessita da liberação da celulose e hemicelulose complexada com lignina, a partir da deslignificação da lignocelulose. A segunda parte do processo envolve a despolimerização dos polímeros de carboidratos para que haja formação de açúcares metabolizáveis (GALBE e ZACCHI, 2002). O xilitol é um adoçante não carcinogênico, sendo encontrado em uma variedade de produtos comerciais. A rota simplificada de produção do etanol e xilitol está ilustrada na figura 6.

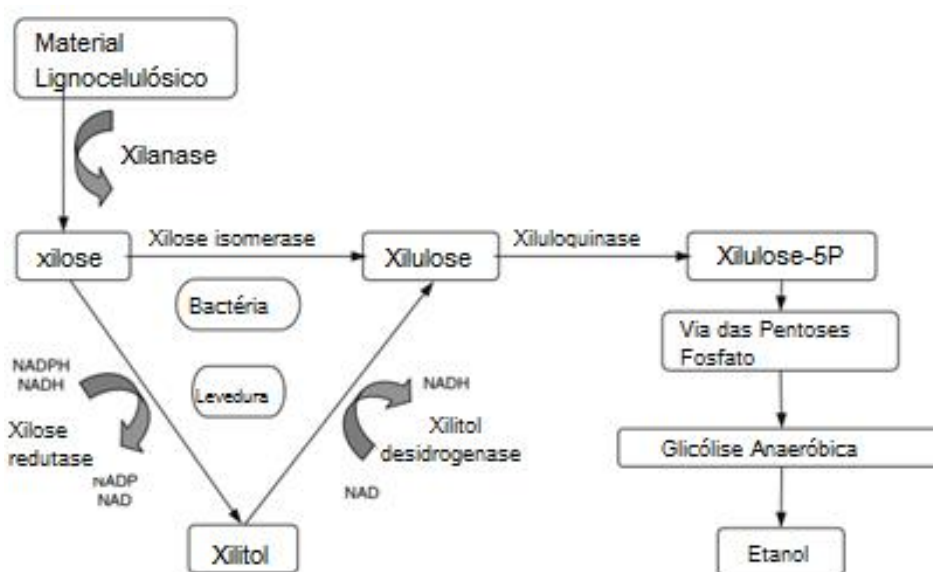


Figura 6: Esquema simplificado da rota de obtenção de etanol e xilitol por microrganismos (POLIZELI, 2005)

1.4 Peptidases

As peptidases são enzimas responsáveis por catalisar a reação de hidrólise das ligações peptídicas que ligam os aminoácidos nas proteínas (SOUZA, *et al.*, 2017). Sua ação é essencial no metabolismo, atuando na digestão de proteínas alimentares, divisão celular, processamento de hormônios e apoptose.

Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com sua ação nos substratos proteicos. As peptidases são classificadas como exopeptidases quando hidrolisam a ligação peptídica próxima ao grupamento carboxi ou amino terminal, ainda podendo também ser classificadas como aminopeptidases, quando clivam próximo ao grupo amino ou carboxipeptidases, quando clivam próximo ao grupo carboxila. As

endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas distantes dos grupos terminais da proteína (SAWANT e NAGENDRAN, 2014).

As peptidases participam de diversos mecanismos fisiológicos, dentre eles o processo de inflamação, coagulação do sangue, crescimento de tumores e metástases, transporte e secreção de proteínas na membrana celular e catabolismo de proteínas. (GIOVANINI, 2014)

Devido a sua função catalítica, as peptidases podem ser um fator negativo quando o objetivo é a produção de metabólitos de interesse. A ação das peptidases podem influenciar a atividade enzimática de enzimas de interesse biotecnológico, uma vez que estas hidrolisam as ligações peptídicas das enzimas, degradando-as (GIOVANINI, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa a utilização de um residuo proveniente do beneficiamento do cacau, o farelo de cacau, para produção e caracterização de xilanases de interesse comercial a partir da fermentação no estado sólido

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a cinética de produção de xilanases do fungo *Aspergillus awamori* cultivado por FES em farelo de cacau;
- Estudar por meio da técnica de planejamento experimental a influência da temperatura e do pH na atividade da xilanase obtida por FES;
- Estudar a estabilidade de xilanases comerciais e obtidas por FES a diferentes temperaturas e valores de pH;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria Prima

Para realizar a fermentação em estado sólido, foi utilizado como resíduo o farelo de cacau triturado, obtido através do processamento das sementes do fruto para fabricação de chocolate e proveniente da fábrica CEPLAC, localizada ao sul da Bahia.

3.2 Microrganismo

Utilizou-se o fungo *Aspergillus awamori* (IOC 3914), obtido da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC; Rio de Janeiro, Brasil).

3.3 Propagação de Inóculo

Os esporos foram obtidos a partir do crescimento do fungo a 30°C por um período de 7 dias em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*). A recuperação dos esporos foi realizada utilizando-se tampão fosfato de sódio (50 mM, pH = 7) e a concentração determinada em câmara de Neubauer. Utilizou-se uma concentração de inóculo equivalente a 4×10^7 esporos/g de farelo de cacau. (AMORIM, 2016).

3.4 Processo de FES

Para a fermentação, foram utilizados 15 g do farelo de cacau com granulometria inferior a 1,70 mm, suplementado com 2% de Ureia (AMORIM, 2016), formando um leito de aproximadamente 1 cm de altura em béquer de 600 ml. A umidade inicial foi ajustada para 60% e o processo foi conduzido em câmara climática com temperatura e umidade controladas (30°C, 90% respectivamente).

3.5 Medida de pH

Foram adicionados 5 mL de água destilada a 0,5 g de material fermentado. A mistura foi agitada vigorosamente, ficando em repouso por 10 minutos. Após isso, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro (GUTARRA, 2003).

3.6 Medida de Umidade

O teor de umidade do material fermentado foi medido em balança determinadora de umidade (GODOY, GUTARRA, *et al.*, 2009).

3.7 Atividade de água

A atividade de água do material fermentado foi medida em higrômetro (GODOY, GUTARRA, *et al.*, 2009)

3.8 Extração de Xilanase e Peptidase

A extração das enzimas foi realizada utilizando primeiramente, tampão citrato de sódio (50 mM, pH=5) e, nas ultimas extrações, água destilada, na proporção 5 mL/g de material fermentado, em agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. Em seguida, o farelo de cacau foi prensado manualmente, resultando no extrato enzimático bruto. Uma alíquota (1 mL) desse extrato foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. A atividade enzimática foi medida utilizando este sobrenadante.

3.9 Quantificação da atividade de Xilanase

A atividade de xilanase foi quantificada a partir da concentração de açúcar redutor no meio, uma vez que esta enzima catalisa a conversão de xilana em xilose. Para isto, utilizou-se uma solução de xilana Birchwood (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão universal (BRITTON, H.T.S, ROBINSON, R.A., 1931) (pH=5) 1% (p/v) como substrato. A reação se deu entre 10 µL de extrato enzimático e 90 µL da solução de xilana durante 5 minutos a 40°C. Os açúcares redutores produzidos pela reação foram medidos pelo método do DNS, sendo a absorvância medida a 540 nm. A atividade de xilanase foi determinada de acordo com G.L., 1959, com modificações e expressas em U/g. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio. A curva padrão foi construída a partir de uma solução de xilose 1g/L, utilizando diferentes diluições (G.L., 1959).

3.10 Quantificação da atividade de peptidase

A atividade de peptidase foi quantificada utilizando-se como substrato uma solução de azocaseína (5 g/L) em tampão universal (BRITTON, H.T.S, ROBINSON, R.A., 1931)(pH=5). Foram incubados 50 µL de extrato enzimático com 500 µL da solução de azocaseína, durante 5 minutos a 40°C, em triplicata. A reação é paralisada com a adição de 1 mL de ácido clorídrico 1M, formando um precipitado alaranjado. Assim, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 2 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada a 345 nm (SANTOS, 2014). Uma unidade de atividade enzimática U foi definida como a quantidade de enzima que causa uma diferença unitária de absorvância entre a amostra e seu respectivo branco por minuto, nas condições de ensaio.

3.11 Efeito do pH e da temperatura na atividade da xilanase

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado para determinar as condições de temperatura e pH de reação das xilanases produzidas pelo fungo. Nos ensaios, valores de temperatura e pH variaram de 40 a 65°C (40,0; 43,6; 52,2; 61,4 e 65,0°C) e de 2 a 6 (2,0; 2,6; 4,0; 5,4 e 6,0), respectivamente. A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

3.12 Estabilidade térmica e ao pH

O monitoramento da estabilidade térmica e ao pH foi realizado incubando o extrato enzimático em diferentes temperaturas e valores de pH, onde para cada temperatura foram testadas todas as variações de pH. Os valores variaram de 30 a 60°C (30, 40, 50 e 60°C) e de 4,0 a 7,0 (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0). As amostras ficaram incubadas em cada temperatura por uma hora e então a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.9. Testou-se a estabilidade da enzima obtida pela FES e da enzima comercial CeluMax C (PROZYN).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de produção de xilanase

A produção de xilanase, os valores de umidade, atividade de água (a_w), e pH ao longo do tempo de cultivo estão representados na figura 7.

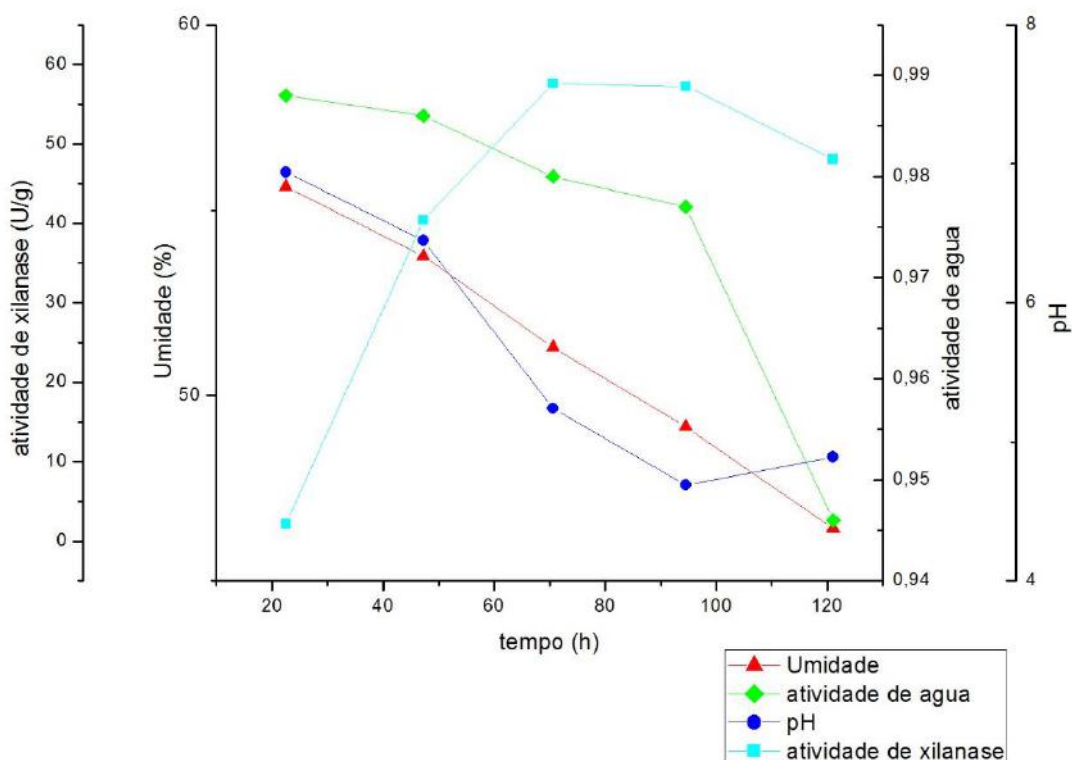


Figura 7: Perfil de produção de xilanase do fungo *A. awamori* em farelo de cacau (suplementado com 2% de Ureia) a 30°C e 60% de umidade inicial.

A produção de xilanase atingiu o seu máximo em 72h de cultivo e após 120h começou a ocorrer a queda da atividade desta enzima. Desta forma, o tempo de 72h foi escolhido para realizar os estudos de estabilidade e influência da temperatura e pH.

Os resultados de atividade enzimática obtidos neste trabalho foram maiores ou similares àqueles encontrados em alguns trabalhos presentes na literatura. ZÚÑIGA (2010) obteve uma produção de xilanase equivalente a 26,07 U/g por *A. niger* por meio de FES em bagaço de cana submetido à pré-tratamento hidrotérmico. BOTELLA *et al.* (2005) encontraram a atividade máxima (40,4 U/g), após 24h de fermentação, utilizando o fungo *Aspergillus awamori* em bagaço de uva como meio sólido. A

atividade de xilanase atingiu cerca de 60 U/g quando se cresceu o fungo *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo. A umidade inicial foi ajustada para 67% e o processo fermentativo foi conduzido a 30°C por 4 dias (YAMANE, FUJITA, *et al.*, 2002). Ao realizar a FES utilizando o fungo *A. awamori* e bagaço de tomate como substrato, UMSZA-GUEZ *et al.* (2011) obtiveram uma atividade máxima equivalente a 100 U/g. Já L.M.F. GOTTSCHALK, *et al.* (2013) obtiveram como resultado uma atividade de xilanase máxima igual a 99 U/g por *A. niger* por meio de FES em farelo de trigo, porém, ao trocarem o meio sólido da FES por okara, resíduo insolúvel da fabricação do leite de soja, a atividade máxima obtida foi de 28 U/g.

Durante o processo fermentativo, o pH se manteve caiu de 6,94 para 4,69. Em fungos, o pH em que há maior atividade metabólica, ou seja, maior produção enzimática, é geralmente ácido, na faixa entre 4 e 6 (PEREIRA, 2013). De fato, a maior atividade enzimática foi obtida quando o pH do meio atingiu 5,2. O pH do meio onde se encontra a enzima é um fator determinante para a atividade enzimática (SOBRAL, SANTOS, *et al.*, 2012).

Dos parâmetros que afetam a produção de xilanase por FES, a umidade e a atividade de água tem influência significativa (GERVAIS e MOLIN, 2003). Deste modo, uma possível razão para a redução da atividade enzimática após o tempo de 96 h de cultivo foi a variação da atividade de água durante o processo (0,988 em 24h a 0,946 em 120h), e a diminuição da umidade do meio de cultivo (55,64 em 224h a 46,41% em 120h) (Figura 7)

LU *et al* (2003) concluíram que a produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus* em koji, por meio de fermentação em estado sólido foi altamente afetada pela atividade de água. Segundo os autores, a melhor umidade do meio para produção máxima de enzima se encontra na faixa de 40-50%, o que correspondeu a valores de a_w entre 0,93 a 0,96.

Uma segunda hipótese possível para explicar a redução da atividade da xilanase após 96 horas de cultivo é a produção de peptidases. Devido a sua função catalítica, as peptidases podem ser um fator negativo quando o objetivo é a produção de metabólitos de interesse. A ação das peptidases podem influenciar a atividade enzimática de outras proteínas, uma vez que estas enzimas são responsáveis por

catalisar a reação de hidrólise das ligações peptídicas que ligam os aminoácidos nas proteínas, degradando-as (SOUZA, OLIVEIRA, *et al.*, 2017). (GIOVANINI, 2014).

Para investigar esta hipótese o perfil de produção de peptidases ao longo do cultivo também foi realizado (Figura 8).

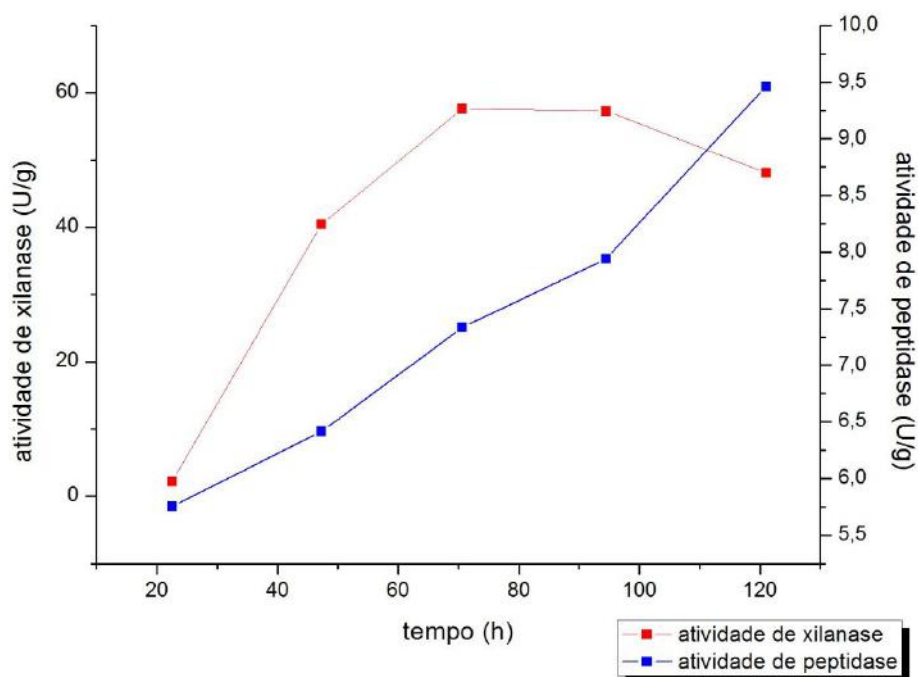


Figura 8: Perfil da atividade de xilanase e peptidase ao longo da FES

Durante o cultivo ocorre uma produção crescente de peptidases atingindo o valor de 9,46 U/g, em 120h de cultivo. Deste modo, a diminuição da atividade xilanásica está muito provavelmente relacionada com a ação destas peptidases.

4.2 Influência da temperatura e pH na atividade xilanásica

O estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade xilanásica foi realizado em 72 h de cultivo quando a atividade enzimática atingiu seu maior valor. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado para investigar as condições de temperatura e pH de reação das xilanases produzidas pelo fungo *A. awamori*.

A combinação dos níveis das variáveis para o DCCR e suas respostas medidas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Valores da atividade de xilanase (A) nas diferentes condições de ensaio do DCCR (níveis codificados e valores reais).

Ensaio	T(°C)	pH	A (U/g)
1	-1(43,6)	-1(2,6)	32,2
2	-1(43,6)	1(5,4)	63,9
3	1(61,4)	-1(2,6)	3,1
4	1(61,4)	1(5,4)	4,2
5	-1,41(40,0)	0(4,0)	60,5
6	1,41(65,0)	0(4,0)	1,9
7	0(52,5)	-1,41(2,0)	5,9
8	0(52,5)	1,41(6,0)	42,8
9	0(52,5)	0(4,0)	43,7
10	0(52,5)	0(4,0)	44,4
11	0(52,5)	0(4,0)	45,3

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software Statistica 7.0, o que permitiu estimar os efeitos das variáveis estudadas, assim como a interação entre elas. Os efeitos padronizados das variáveis (valores de t) e a probabilidade de significância do teste (valor de $p < 0,01$) foram utilizados para avaliar a significância dos efeitos das variáveis na atividade xilanásica. Todas as variáveis estudadas foram consideradas estatisticamente significativas a um intervalo de confiança de 99%, como pode-se observar na figura 9.

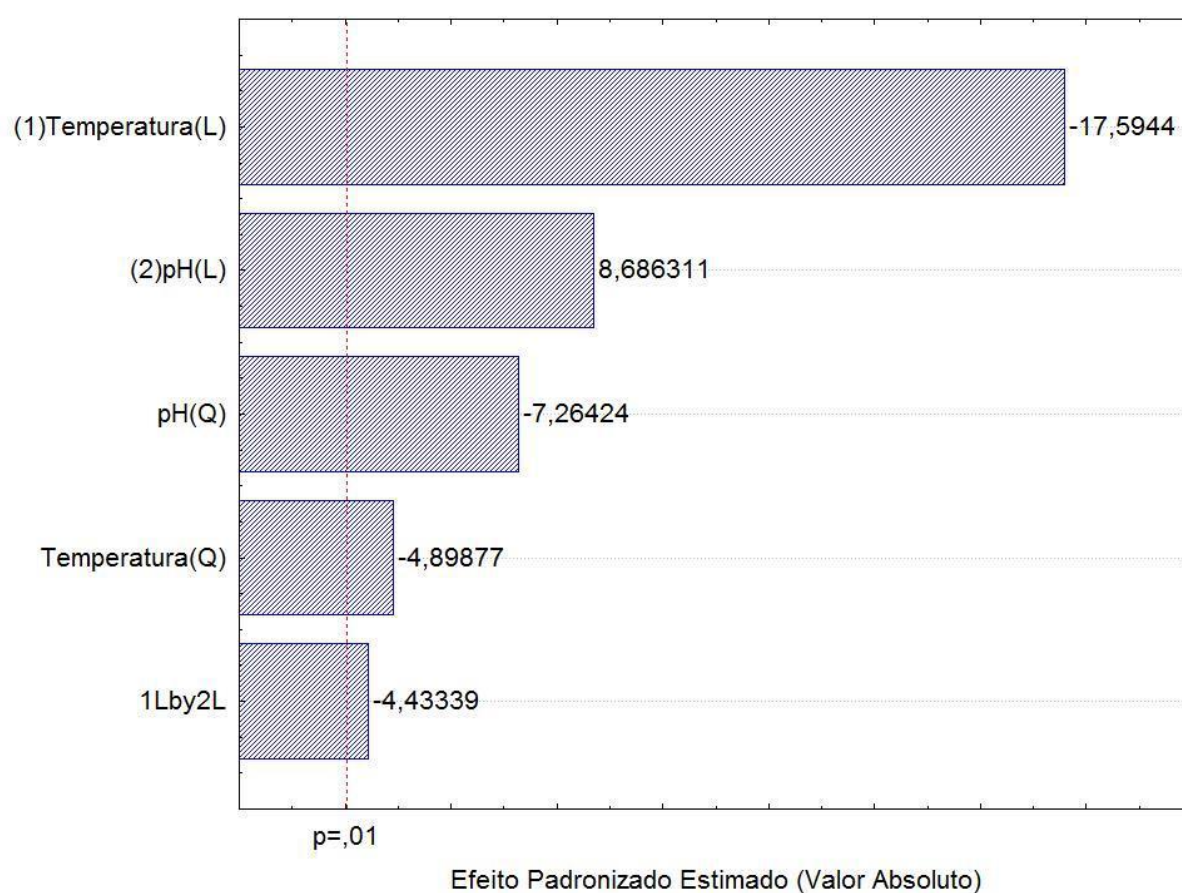


Figura 9: Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados da atividade de xilanase (U/g) após 72h.

Baseado nos dados obtidos, foi possível construir um modelo de segunda ordem capaz de descrever a atividade da preparação bruta de xilanase em função da temperatura e do pH dentro das condições estudadas (Equação 1).

Tabela 3: Coeficientes de regressão para a atividade de xilanase.

Variáveis	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	Teste t	Valor de p
Média	44,5039	1,991809	22,3434	0,000003
Temperatura (L)	-21,4927	1,221562	-17,5944	0,000011
Temperatura (Q)	-7,1406	1,457641	-4,8988	0,004479
pH(L)	10,6109	1,221562	8,6863	0,000334
pH(Q)	-10,5887	1,457641	-7,2642	0,000773
Temperatura x pH	-7,6475	1,724978	-4,4334	0,006807

$$A = 44,5039 - 21,4927.T - 7,1406.T^2 + 10,6109.pH - 10,5886.pH^2 - 7,6475.T.pH$$

(Eq.1)

Onde:

A = Atividade de Xilanase (U/g) em 72h de fermentação;

T = Variável Temperatura Codificada

pH = Variável pH Codificada

A análise de variância (ANOVA) foi realizada a partir das variáveis significativas permitindo o ajuste do modelo gerado. O valor obtido do R^2 foi de 0,989 e o F calculado foi 8,5 vezes o valor crítico de F tabelado (tabela 4).

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) do DCCR para a atividade de xilanase.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{cal}
Regressão	5545,22	5	1109,04	
Resíduos	59,51	5	11,90	
Falta de ajuste	58,242	3	19,41	93,18
Erro puro	1,269	2	0,23	
Total	5604,73	10		

$R^2 = 0,989$; $F_{0,01;5;5} = 10,97$

A figura 10 apresenta os valores obtidos experimentalmente em função dos valores preditos, onde pode-se observar que há concordância entre ambos.

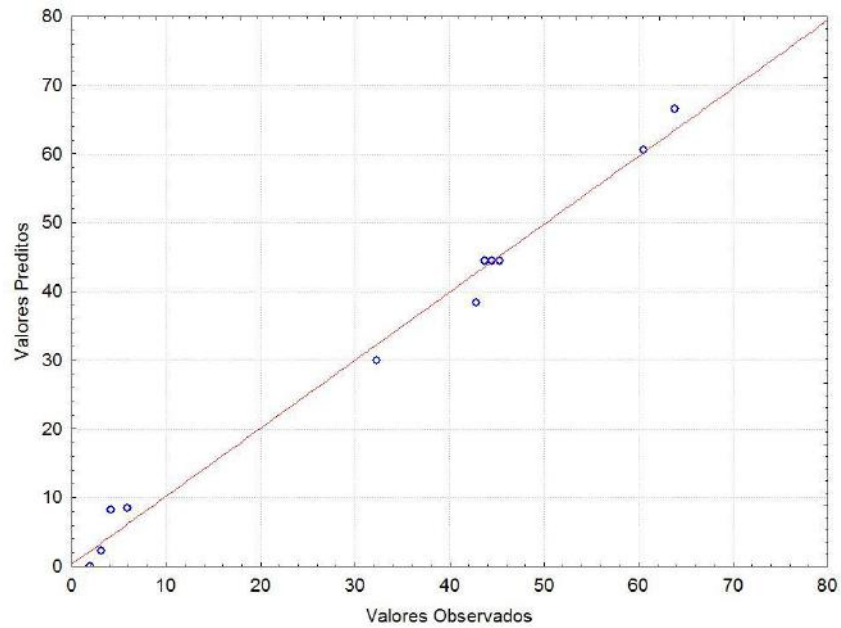


Figura 10: Valores de atividade de xilanase observados x valores de atividades preditos pelo modelo.

A partir do modelo gerado, foi possível construir uma superfície de resposta da atividade de xilanase em função da temperatura e do pH dentro das condições estudadas (figura 11).

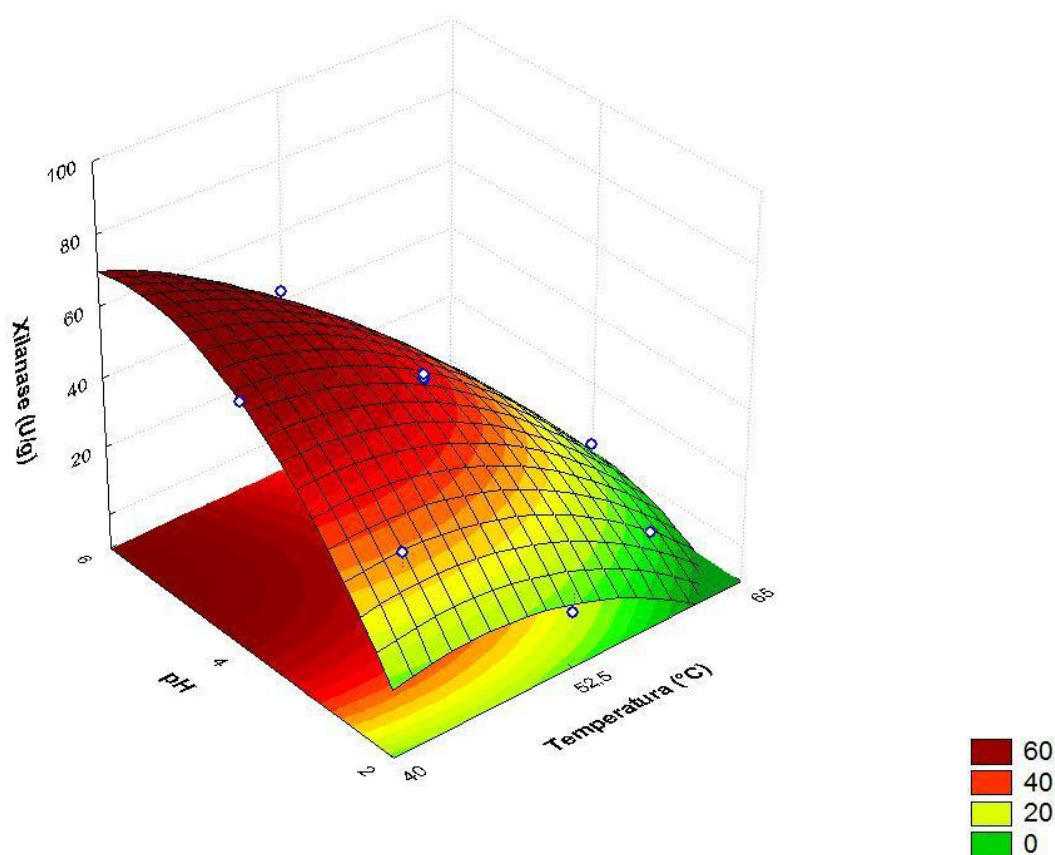


Figura 11: Superfície de resposta para atividade de xilanase (U/g) em função da temperatura e pH.

Por meio do modelo obtido, foi possível identificar a faixa de temperatura e pH onde os maiores valores de atividade enzimática de xilanases produzidas por FES em farelo de cacau são encontrados. As atividades enzimáticas mais elevadas são encontradas quando a reação ocorre numa faixa de temperatura entre 40 e 50°C e com o pH variando de 6 a 4. Ao se trabalhar dentro desta faixa não há perdas significativas na atividade enzimática. O modelo prediz, dentro das condições estudadas, que a atividade máxima (70,5 U/g) é atingida quando a temperatura da reação é 40°C e o pH reacional é 5,8. Para validação, seria necessário realizar a reação enzimática nessas condições.

Como pode-se observar no gráfico de Pareto (Figura 9), a temperatura é a variável reacional que mais afeta a atividade enzimática, de modo que a atividade de xilanase atinge valores mais altos para valores menores de temperatura, dentro das condições estudadas. A velocidade de uma reação aumenta com o aumento da temperatura, porém, nas reações enzimáticas, ao se atingir uma determinada

temperatura, a velocidade da reação diminui bruscamente. Isto ocorre porque, inicialmente, o aumento da temperatura provoca o aumento do grau de agitação das moléculas, tornando maior a possibilidade de a enzima encontrar o substrato e reagir. Contudo, ao se elevar mais ainda a temperatura, as interações que estabilizam a estrutura da enzima se rompem, provocando a desnaturação enzimática com consequente perda de atividade (NELSON, D; COX, M, 2011).

A faixa de temperatura ótima encontrada neste trabalho (40-50°C) está de acordo com outras encontradas na literatura. KRONBAUER *et al.* (2007) encontraram uma temperatura ótima de 50°C na xilanase produzida por *Aspergillus casielus* em bagaço de cevada. Em *Aspergillus phoenicis*, três tipos de xilanases parcialmente purificadas apresentaram temperatura ótimas entre 45 e 50°C (RIZZATTI, SANDRIM, *et al.*, 2004).

Segundo o gráfico de Pareto, o pH também influencia a atividade enzimática de forma que, dentro das condições estudadas, atividades enzimáticas elevadas estão relacionados com valores de pH mais altos (na faixa estudada). O pH atua sobre a estabilidade da estrutura da enzima e sobre a catálise propriamente dita. Faixas muito extremas de pH, sejam alcalinas ou ácidas, provocam destestabilização da estrutura enzimática levando a desnaturação (CHAMPE, P.C.; HARVEY R.A, 2006). Por outro lado, faixas intermediárias de pH influenciam o mecanismo de catálise enzimática, já que promovem a protonação ou desprotonação dos grupos do centro catalítico que participam da reação enzimática (NELSON, D; COX, M, 2011). A maioria das xilanases fúngicas relatadas até o momento apresentam pH ótimo ácido, entre 4,5 e 6,5 ou no intervalo de pH neutro (SOBRAL, *et al.*, 2012).

4.3 Estabilidade térmica e ao pH

Os resultados da estabilidade térmica e ao pH para a preparação bruta de xilanases obtidas por FES estão apresentados na Tabela 5. A preparação bruta de xilanases apresentou uma boa estabilidade para temperaturas de 30 e 40°C numa ampla faixa de pH com atividades residuais acima de 87%. Nas temperaturas de 50 e 60°C, esta preparação se apresentou bastante instável, com perda de cerca de 85% de sua atividade após 1 h de incubação nestas temperaturas para todos os pHs investigados.

Tabela 5: Estabilidade térmica e ao pH de xilanase obtida por *A.awamori* através de FES em farelo de cacau.

Temperatura (°C)	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
30	89%	115%	168%	133%
40	90%	104%	161%	87%
50	16%	12%	15%	15%
60	15%	16%	15%	8%

KRONBAUER, *et al.* (2007) observaram que a atividade da xilanase obtida por *A. casielus* em bagaço de cevada, teve uma perda de apenas 18% após 90 minutos de incubação a 45°C. Segundo LEMOS *et al* (2000) a xilanase produzida por *A.awamori*, em bagaço de cana, mostrou boa estabilidade térmica nas temperaturas de 30 a 40°C durante 300 minutos de incubação.

A estabilidade da enzima comercial CeluMax C nas temperaturas de 30, 40 ,50 e 60°C e pH 4, 5, 6 e 7 está representada na Tabela 6.

Tabela 6: Estabilidade Térmica e ao pH da enzima comercial CeluMax C (PROZYN).

Temperatura (°C)	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
30	135%	147%	123%	127%
40	113%	99%	90%	84%
50	86%	30%	43%	4%
60	10%	16%	4%	17%

Tanto a enzima comercial como a preparação bruta de xilanases sofreram ativação enzimática quando incubadas a 30°C, em toda faixa de pH estudada, onde a maior ativação ocorreu em pH 6 (168%) para o preparado bruto de xilanases e em pH 5 (147%) para a enzima comercial. Já a 40°C, a preparação bruta de xilanases sofreu este processo de ativação em pH 5 e 6, onde novamente a maior ativação (161%) ocorreu em pH 6, para a enzima comercial este processo se deu apenas em pH 4. A enzima comercial CeluMax C apresentou melhor estabilidade em pH 4

quando comparado a preparação bruta de xilanases, perdendo apenas 14% de sua atividade enzimática a 50°C, enquanto a preparação bruta de xilanases perdeu cerca de 84% da sua atividade residual na mesma faixa de temperatura e pH. Já a preparação bruta de xilanases se mostrou mais estável que a enzima comercial a 40°C. Ambas as enzimas demonstraram alta instabilidade a 60°C em toda faixa de pH, havendo perda de atividade relativa em torno de 85-90%,

A preparação bruta de xilanase obtida por FES se mostrou estável em temperaturas amenas (30-40°C), podendo ser então utilizadas na indústria de panificação, onde são adicionadas no momento do preparo da massa. Um trabalho que estuda o bioprocessamento de pães visando melhorias na qualidade tecnológica e o aumento da atividade antioxidante vem sendo realizado utilizando o preparado bruto de xilanases obtido pelo presente trabalho. Como resultado, os pães bioprocessados com o preparado bruto de xilanases apresentaram melhora significativa de volume, gerando um aumento de 18% em média, e diminuição de densidade de 17%, em média quando comparado ao pão não processado. Além da melhoria na massa, o uso do preparado bruto de xilanases proporcionou também o aumento de 49% na atividade antioxidante e o aumento de 169% no teor de ácido ferúlico em comparação ao pão não bioprocessado.

5 CONCLUSÃO

Por meio de fermentação em estado sólido, o fungo *A. awamori* cresceu em meio contendo farelo de cacau suplementado com 2% de ureia, produzindo a enzima xilanase no decorrer do processo. A maior atividade enzimática, 57,59 U/g de fermentado, foi obtida no tempo de aproximadamente 72h de cultivo.

Por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) as condições de pH e temperatura da reação enzimática foram investigadas. As xilanases produzidas por FES apresentaram maiores atividades na faixa de temperatura entre 40 e 50°C e pH entre 4,0 e 6,0.

Além disto, as xilanases se mostraram estáveis em pH variando de 4,0 a 7,0 (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) nas temperaturas iguais a 30 e 40°C, mantendo atividades residuais acima de 87% após uma hora de incubação. A 40°C, a preparação bruta de xilanases se mostraram mais estáveis que a enzima comercial CeluMax C (PROZYN). No entanto, a enzima comercial apresentou maior estabilidade em pH 4, na faixa de 30-50°C.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, C. C. **XLIQUEFAÇÃO DE FARELO DE TRIGO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO SUBMERSO DE *Aspergillus niger***. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2017.

AMORIM, G. M. **FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE CACAU (*Theobroma*)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2016.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento protéico do mandacaru sem espinhos *Cereus jamacaru* (P.DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) por fermentação semi-sólida**. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB, p. 195. 2004.

BECKER, NATALIA BRANCO; BARATTO, CÉSAR MILTON, GELINSKI, JANE MARY LAFAYETTE NEVES. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. **Evidência**, Joaçaba, v. 9, p. 67-82, janeiro/dezembro 2009.

BIELY, P. **Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases**. In: Hemicellulose and hemicellulases. London. 1993.

BOTELLA, C. et al. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochem Eng J**, v. 26, p. 100–6, 2005.

BOTELLA, C. et al. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98–101, 2007.

BRAGA, L. G. T. et al. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de coprodutos agroindustriais para tilápia do Nilo. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 11, p. 1127-1136, out/dez 2010. ISSN 4.

BRITTON, H.T.S, ROBINSON, R.A. Universal Buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1456-1462, 1931.

CARDOSO, S. A. et al. Utilização de resíduos de cacau para a produção de energia no Estado do Pará. **Enc. Energ. Meio Rural**, n. 4, 2002.

CARVALHO, G. G. P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; PEREIRA, O.G.; FERNANDES, F.E.P.; CECOM, P.R.; AZEVÊDO, J.A.G. racionamento de proteínas de silagem decapim. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 648-656, jul./set 2008. ISSN 3.

CARVALHO, V. G. **Comunidades de fungos em solo do cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão**. Lavras-UFLA. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia agrícola, Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 62. 2008.

CASTRO, A. M. et al. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 151–158, 2010.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 303–308, 2015.

CHAMPE, P.C.; HARVEY R.A. Enzimas. In: *Bioquímica Ilustrada*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, v. único, 2006. p. 55-58.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 2, p. 291-302, 2006.

DEKKER, R. F. . R. G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification. **Chem. Biochem**, v. 32, p. 277-352, 1976.

EDELSTEIN, L.; SEGEL, L. A. Growth and metabolism in mycelial fungi. **Journal of Theoretical Biology**, v. 104, p. 187-210, 1983.

F. L. MOTTA, C. C. P. A. A. M. H. A. S. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. **INTECH**, p. 251-275, 2013.

G.L., M. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry** , v. 31, p. 426-428, 1959, 1959.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 618-628, 2002.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GIOVANINI, G. T. **Produção, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo Scopulariopsis koningii**. Universidade de São Paulo. Ribeirao Preto. 2014.

GODOY, M. G. D. Valoração e biodestoxificação das tortas de mamona (*Ricinus communis*) e pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) por fermentação em estado sólido. Rio de Janeiro: [s.n.], 2013.

GODOY, M. G. et al. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 317–322, 2009.

GRAJEK, W., GERVAIS, P. P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, 1997.

GUTARRA, M. L. E. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido: estudo de fungos produtores e estudo das condições de cultivo** Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro, p. 127. 2003.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1327–1341, 2015.

HELD, P. **Enzymatic Digestion of Polysaccharides**. BioTek Instruments. Vermont. 2012.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanase. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 337-342, 1996.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Curr Opin Biotechnol**, v. 7, n. 3, p. 337-342, Jun 1996.

KRONBAUER, E.L.W.; PERALTA, R.M.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M.KM. PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Aspergillus casielus* COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 25, p. 207-206, jul/dez 2007. ISSN 2.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 23, n. 4, p. 411-456, Jul 1999.

L.M.F. GOTTSCHALK, E.F. SOUZA, L.A.N. VIANA, S.C. T. COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS XILANASE E FERULOIL ESTERASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA PELA CEPA MUTANTE *Aspergillus niger* 3T5B8. **XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, Foz do Iguaçu, jul-ago 2013.

LARA, C. A. **Xilanases de leveduras e fungos leveduriformes e sua aplicação em processos de produção de bioetanol lignocelulósico e panificação**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2013.

LEMOS, J. L. S. et al. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n.3 p. 206-211, jul./set. 2000. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 206-211, jul./set. 2000.

LIMA, E. M. A. **Caracterização da inibição de Xilanases GH11 por acoplamento proteína-proteína: uma investigação por dinâmica molecular**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2016.

LU, W.; LII, D.; WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 305-311, 2003.

MALA B. RAO, APATNA M TANSKALE, MOHINE S GHATGER, VASANTI V DESHPANDE. Molecular and Biotechnological aspects of Microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 596-635, 1998.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

NELSON, D; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. [S.I.]: Omega, 2011.

NETO, A. R. et al. **Farelo de cacau na dieta de novilhas leiteiras: viabilidade econômica**. ABZ (Associação Brasileira de Zootecnistas). PB – UFPB/ABZ. João Pessoa, PB. 2008.

OLIVEIRA, D. S. **Aplicação de xilanase e/ou ciclodextrina glicosiltransferase (CGTASE) na produção de pães**. Universidade Estadual Paulista. são josé do rio preto. 2010.

ONYSKO, K. A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. **Biotechnol. Adv.**, v. 11, n. 2, p. 179-98, 1992.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de PósGraduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 169. 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PERAZZO NETO, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia fícus - indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger*.** Tese (Doutorado). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. 1999.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado.** Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2013.

PINTO, G. A. S. E. A. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico 102**, Fortaleza, Agosto 2005.

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Empapa, comunicado técnico**, Fortaleza, Agosto 2005.

PIRES, A. J. V. et al. Níveis de Farelo de Cacau (*Theobroma cacao*) na alimentação de bovinos. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. 6, n. 2, Fevereiro 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. E. A. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 67, p. 577-591, 2005.

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127 – 35, 2003.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 161-179, Mar-Apr 2006.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 14, 1998.

RIZZATTI, A. C. S. et al. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermo tolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**31, p. 88-93, 2004.

RODRIGUES, M. et al. **Chocolate**. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/pga/0708/trabalhos/pga_07_08_chocolatefinal.pdf>. Acesso em: 12 Julho 2017.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSH, S. Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Ccontrol**, Kidlington, v. 29, p. 167-187, 2013.

SANTOS, A. F. **Prospecção e Produção de proteases bacterianas por fermentação em estado sólido**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica)Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2014.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, S. PROTEASE: AN ENZYME WITH MULTIPLE INDUSTRIAL APPLICATIONS. **WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 3, p. 568-579, 2014. ISSN 6.

SILVA, H. G. D. O. et al. Effects of feeding cocoa meal (*Theobroma cacao* L.) and palm kernel cake (*Elaeis guineensis*, Jacq) on milk intake and yield for lactating goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1786-1794, set./out. 2005.

SINHA, R.; KHARE, S. K. Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. Emb13: characterization of its protease for detergent application. **Indian Journal Biotechnology**, v. 11, p. 416-426, 2012.

SOBRAL, G. G. et al. **Efeito do pH na atividade da xilanase produzida por *Aspegillus aculeatus* URM 6603**. XII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX. UFRPE: Recife, p. 1-3. 2012.

SORENSEN, J. F. E. A. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications.. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 22, p. 275-287, 2002.

SOUZA, T. F. D. et al. MAPEAMENTO TECNOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE PROTEASES EM DETERGENTES E COMPOSIÇÕES DE LIMPEZA. **Cad. Prospec**, Salvador, v. 10, p. 226-236, abri-jun 2017. ISSN 2.

SUNNA A, A. G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.

TAN, L.U.L., MAYERS, P., SADDLER, J.N. Purification and characterization of athermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **J. Microbiol**, n. 33, p. 689-692, 1987.

UMSZA-GUEZ, M. A. et al. Xylanase production by *aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1585-1597, Jun 2011.

VIEIRA, D. S. **Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via simulação molecular**. Ribeirão Preto. 2007.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4- xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiol Rev** , v. 52, n. 3, p. 305–317, 1988.

YAMANE, Y. et al. Production of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae* and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. **J. Biosci. Bioeng.** , v. 93, p. 9-14, 2002.

ZÚÑIGA, U. F. R. **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES ESPECÍFICAS NA CADEIA PRODUTIVA DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**. Universidade de São Paulo. São Carlos. 2010.